УДК 619:616.98:578.832.1:636.52/.58:616-097.3

**А.С. Иголкин, М.А. Циванюк, Т.Б. Манин, С.В. Фролов, С.К. Старов**

# ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА И НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

## Введение

Высокопатогенный грипп птиц (чума птиц, ВПГП) – крайне контагиозная, пантропная, системная болезнь домашних и диких птиц различных видов, способная протекать в форме эпизоотий и наносить большой экономический ущерб в сфере производства птицеводческой продукции и торговле [5]. Возбудителем заболевания является вирус семейства *Orthomyxoviridae*, рода *Influenzaevirus*, тип А [2]. По строению поверхностных гликопротеинов вирусы гриппа птиц (ВПГ) разделяют на 16 подтипов по гемагглютинину (H1-16) и 9 подтипов по нейраминидазе (N1-9) [1].

Ньюкаслская болезнь (псевдочума птиц, НБ) – высококонтагиозная вирусная болезнь птиц в основном отряда куриных, характеризующаяся поражением органов дыхания, пищеварительной и центральной нервной системы [3]. Возбудителем НБ является птичий парамиксовирус 1 (APMV-1). APMV объединены в род *Avulovirus* семейства *Paramyxoviridae* [4]. Вирус НБ может широко варьировать по типу и остроте вызываемого заболевания. НБ зарегистрирована на всех континентах (кроме стран Океании) и наносит большой экономический ущерб.

Двумя основными направлениями осуществления биобезопасности Российской Федерации является недопущение заноса и профилактика особо опасных болезней животных на территории России. К таким заболеваниям относятся грипп птиц и болезнь Ньюкасла. Эти две вирусные инфекции птиц по классификации МЭБ входят в список особо опасных заболеваний и подлежат обязательному уведомлению. В РФ вакцинация промышленного поголовья против НБ является обязательной. Обычно для иммунизации поголовья в птицеводческих хозяйствах РФ применяют живые и инактивированные моно- и поливалентные вакцины против НБ. Вакцинация же, промышленного поголовья против ГП в РФ не проводится. Вспышки гриппа птиц в различных регионах РФ в 2005-2007 гг. подтвердили, насколько реальна опасность заноса и возникновения очагов этой болезни на территории России. В дальнейшем вспышки ГП и НБ в РФ будут иметь серьёзные последствия как для промышленных птицепредприятий, так и для небольших фермерских хозяйств, т.к. их экономическая рентабельность в современных условиях будет поставлена под угрозу. Очевидно, что в сложившихся условиях существует актуальность разработки и испытания инактивированных ассоциированных вакцин против болезни Ньюкасла и гриппа птиц.

## Материалы и методы

Вакцины. В работе был использован вирус болезни Ньюкасла штамм «Ла-сота», полученный на куриных эмбрионах с биологическим титром 10,5 $лог_2$, инактивированный аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ), в течение 24 часов при температуре +20-22° С. Также был использован штамм H5N1 вируса ГП, полученный на SPF-куриных эмбрионах с титром инфекционной активности 10 $лог_2$, инактивированный 10% бета-пропилактоном в конечной концентрации 0,5% при температуре +20-22° С, в течение 24 часов.

Для создания образцов вакцин использовали масляный адъювант Монтанид ISA-70 («СЕППИК», Франция).

Животные. Для проведения опыта использовались цыплята 85-дневного возраста породы Хайсекс-коричневый, в количестве 50 голов. Птица была привита против гидроперикардита кур.

Диагностика. В диагностике использовали серологические методы: реакцию гемагглютинации (РГА) и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), которые проводили по общепринятой методике с использованием панели специфических сывороток к болезни Ньюкасла шт. «Ла-сота» и вирусу гриппа птиц подтипа Н5.

## Результаты и их обсуждение

Полноту инактивации вирусов ньюкаслской болезни и гриппа птиц определяли методом трехкратных пассажей на развивающихся эмбрионах СПФ-кур 11-суточного возраста («Lohman», Германия).

В аллантоисной жидкости из зара-

Таблица 1

**Уровень титров антител у цыплят в РТГА к вирусу ГП после однократной вакцинации**

| Наименование вакцины | Титр антител, $log_2$ | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | через 7 дней | через 14 дней | через 21 день | через 28 дней | через 35 дней | через 42 дня | через 49 дней | через 56 дней |
| Контроль | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Моновалентная вакцина против ГП | 0 | 7,125 | 4,875 | 6,125 | 3,875 | 5,825 | 6,25 | 5,375 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 60/40 | 0 | 7,5 | 5,375 | 6,375 | 5,625 | 4,25 | 5 | 3,5 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 50/50 | 0 | 7,825 | 5,5 | 7,125 | 6,25 | 4,5 | 5,5 | 4 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 70/30 | 0 | 6,875 | 5,125 | 5,75 | 5,625 | 4,625 | 4 | 3 |

Таблица 2

**Уровень титров антител у цыплят в РТГА к вирусу НБ после однократной вакцинации**

| Наименование вакцины | Титр антител, $log_2$ | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | через 7 дней | через 14 дней | через 21 день | через 28 дней | через 35 дней | через 42 дня | через 49 дней | через 56 дней |
| Контроль | 4 | 3,5 | 4,5 | 5,5 | 7,5 | 7 | 8,5 | 6 |
| Моновалентная вакцина против НБ | 8,25 | 12 | 12 | 12 | 11,625 | 7,825 | 10,375 | 9,25 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 60/40 | 6,75 | 10,125 | 10,5 | 10,875 | 10,25 | 8,5 | 9 | 10,25 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 50/50 | 9,5 | 10 | 11,625 | 11,5 | 11,625 | 9 | 9,75 | 10,25 |
| Ассоциированная вакцина против ГП и НБ, соотн. 70/30 | 6 | 9,5 | 10,375 | 10,875 | 10 | 7,875 | 9,25 | 8,5 |

женных эмбрионов всех трех пассажей отмечали отсутствие гемагглютинирующей активности.

Для проведения экспериментальных исследований было изготовлено два образца инактивированных моновакцин против НБ и ГП и три образца инктивированных ассоциированных вакцин против НБ и ГП в процентном соотношении антигенов 40/60, 50/50, 30/70, соответственно. Полученную смесь объединяли с масляным адъювантом в соотношении 30:70 и эмульгировали в гомогенизаторе Silverson 450 LS при температуре 4-12° С в течение 5 минут при 6000 об/мин.

Для определения фонового титра специфических антител выборочно были взяты образцы крови от 10 голов птиц для постановки РТГА. Цыплята оказались серонегативны к вирусу ГП и имели средний титр антител к вирусу НБ 3,6 $log_2$.

Птица была разделена на шесть групп (10 голов - контроль, 5 групп по 8 голов) и вакцинирована изготовленными экспериментальными образцами вакцин. Иммунизацию проводили во внутреннюю поверхность правого бедра в дозе 0,5 мл/гол.

Для определения иммунного статуса у экспериментальных цыплят после введения опытных образцов вакцин использовали РГА и РТГА по описанным методикам. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Как показывают полученные экспериментальные данные (табл. 1 и 2), у вакцинированной птицы вырабатывались специфические антитела к возбудителю НБ и ГП уже на 7-е сутки наблюдения. Было установлено, что все исследуемые экспериментальные образцы вакцин индуцируют у однократно привитых цыплят формирование высокого уровня гуморального иммунитета к вирусу ГП и НБ уже через 14 суток после прививки. Пик показателей наблюдается к возбудителю ГП на 28 день, а к возбудителю НБ – на 35 сутки.

При дальнейшем исследовании уровень антител к обеим инфекциям постепенно снижался и на 56 сутки (период исследования) составил 4,1875±1,1875 $log_2$ к вирусу ГП, а к вирусу НБ – 9,375±0,875 $log_2$. Исследованиями установлено, что среди ассоциированных экспериментальных вакцин наиболее эффективный иммунный ответ у птицы вызывает образец с антигенным соотношением 50/50 к возбудителям ГП и НБ.

Также следует отметить, что общее состояние иммунизированных цыплят в течение всего периода наблюдений было удовлетворительным. Физиологические показатели у привитых цыплят не отличались от таковых у птиц контрольной группы.

**Выводы**

Таким образом, можно заключить, что экспериментальные образцы инактивированных ассоциированных вакцин против ГП и НБ с различным соотношением антигенов индуцируют у вакцинированного поголовья образование высокого уровня специфических антител к вирусу гриппа птиц и болезни Ньюкасла.

Образец экспериментальной инактивированной ассоциированной вакцины против ГП и НБ с антигенным соотношением 50/50 обладает наибольшей антигенной активностью и может быть использован для дальнейшего изучения и возможности внедрения в ветеринарную практику.

**РЕЗЮМЕ**

**В статье представлены результаты исследований динамики иммунного ответа у птиц после введения экспериментальных образцов вакцин против гриппа птиц (ГП) и болезни Ньюкасла (НБ). В опыте были использованы две моновалентные вакцины против ГП и НБ и три образца ассоциированных вакцин против ГП и НБ с антигенным соотношением 60/40, 50/50 и 70/30, соответственно. По результатам проведенных исследований было установлено, что образец вакцины с антигенным соотношением 50/50 обладает наибольшей антигенной активностью и может быть использован для дальнейшего изучения.**

**SUMMARY**

**In this paper the results of investigations aimed at studying the immune response dynamics in poultry after administration of the experimental vaccine against avian influenza and Newcastle disease are shown. Two monovalent vaccines against avian influenza and Newcastle disease and three samples of associated vaccines against avian influenza and Newcastle disease with the antigenic ratio of 60/40; 50/50 and 70/30, respectively, were used in the trial. The results of the trial suggest that the vaccine sample with the antigenic ratio of 50/50 possesses the greatest antigenic activity and can be used for further investigations.**

Литература

1. Грипп: обзор литературы / Н.С. Дудникова, В.В. Дрыгин, Л.О. Щербакова, А.В. Андриясов. Владимир, 2005. 59 с.
2. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А.А. Конопаткин, И.А. Бакулов, Я.В. Нуйкин [и др.]. М.: Колос, 1984. С. 457-466.
3. Swayne, D.E. Influenza / D.E. Swayne, D.A. Halvorson // Diseases of Poultry. 11th ed. Ames, Iowa, 2003. P. 135-160.
4. Highly pathogenic avian influenza // O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. – Paris, 2004. Vol. 1. P. 258-269.
5. Mayo, M. A. Virus taxonomy-Houston 2002 / M. A. Mayo // Arch. Virol. 2002. Vol. 147. P. 1071-1076.

УДК 619:578.825.1: 57.082.26

**Е.В. Курненкова, Ш.К. Куляшбекова, Е.А. Кудакова, А.В. Борисов, М.И. Шульпин, В.В. Дрыгин**

# КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММА Md5 ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА НА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

**Введение**

Для первичного выделения высоковирулентных вирусов болезни Марека (ВБМ) традиционно используют первичные культуры клеток почек куриных эмбрионов или цыплят, культуры фибробластов куриных или утиных эмбрионов. Наилучшие результаты получают на культурах клеток, приготовленных из тканей цыплят с генетически обусловленной высокой восприимчивостью к заражению вирусом болезни Марека [1, 3, 4, 6].

В 2006 году ФГУ «ВНИИЗЖ» был приобретен штамм Md5 высоковирулентного вируса болезни Марека (ввВБМ) из коллекции «Collection of animal viruses and an-